طرائق قياس المناعة الخلطية

يعبر عن طرائق قياس المناعة الخلطية بتعبير اخر وهو قياس التفاعلات التي تجري بين الأضداد (Antibodies) مع المتسضدات (Antigens) ، وهذه التفاعلات تعطينا فكرة عن مدى فاعلية او مستوى الجهاز المناعي الخلطية في الجسم مع العلم ان معظم طرائق القياس تكون خارج الجسم (In Vitro) ، ومن هذه الطرائق ما يلي:

1.استعمال الترسيب

2.استعمال التلازن (Agglutination)

3.استعمال تقنية اللاليزا

(Enzyme Linked Immune Sorbian Assay)

4.استعمال الطريقة الإشعاعية (Radio Immune Assay)

ان اختيار الطريقة لقياس التفاعل بين الضد والمستضد يعتمد على نوع المستضد وكذلك على كمية الاضداد الموجودة في النموذج.

استعمال الترسيب (التفاعل الترسيبي الكمي)

يستعمل هذا النوع من الاختبارات للتفاعل ما بين الاجسام المضادة والمستضدات الذئوبة مثل البروتينات والسموم اضافة الى امكانية استعماله مع الفايروسات ، ويتم هذا التفاعل عن طريق مزج كمية من المستضدات مع مصل يحتوي على الاضداد الخاصة لتلك المستضدات ، نتيجة لهذا المزج يظهر عالق متغيم (Cloudy) او عكر ، وبعد فترة من المزج يتحول الى راسب ابيض يترسب في قعر الانبوبة ، وكمية الراسب تكون متناسبة مع كمية المستضدات المضافة ، ويمكن حساب وزن الراسب بعد تجفيف الانبوبة.

عند وجود زيادة في نسب الاضداد الموجودة في المصل الى كمية المستضدات المضافة فانه لا يمكن ملاحظة حدوث الراسب وكذلك العكس ، أذن يتكون الراسب عندما تكون كمية المستضدات متناسبة مع كمية الاضداد في النموذج ، أي ان هناك نقطة يطلق عليها بنقطة التكافؤ ما بين المستضدات والاضداد تسمى بـ Immunozone Equivalent ، في هذه النقطة يكون تركيز المستضدات الى الاضداد في وضع مثالي ، حيث يكونان معاً شبكة متكاملة ، وبذلك تحدث عملية الترسيب ويظهر بعد ذلك المحلول الطافي بشكل رائق.

يمكن اجراء مثل هذ الفحص في الاوساط شبه الصلبة مثل الاكار (Agar) ، وفي هذه الحالة يوضع كل من المستضدات والاضداد في حفر تصنع او تعمل في الاكار ، وتترك للتنتشر نحو بعضها ، وعند اللتقاء المستضدات مع الاضداد في هذه النقطة يتكون راسب ابيض وهو عبارة عن ترسيب الاضداد للمستضدات الذئوبة ، ويطلق على هذه النقطة بنقطة التكافؤ ، ومن ابسط الطرائق المستعملة في الاكار هو اختبار الانتشار المناعي المزدوج (Double Diffusion Test).

اختبار الانتشار المناعي المزدوج
Ouchterlony Double Diffusion Test

في هذا الفحص يحضر محلول الاكار اما باستعمال Nobel Agar او الـ Agaros ، ويكون تركيز الاكار المستعمل هو 1% ، وبعد اذابة الاكار يصب اما في اطباق بتري او على صفائح الزجاج (سلايدات). بعد ان يتم تبريد الاكار الى درجة تقارب 50-55 مئوي وبعد صب الاطباق يجرى عمل حفر فيه ، ويكون وضع الحفر كالاتي :

عمل حفرة وسطية ومن ثم عمل حفر تحيط هذه الحفرة ، المسافة ما بين وسط الحفرة الدائرية الى وسط الحفرة المحيطية حوالي 7.5 – 9 ملم.

في حالة الكشف عن هوية المستضدات ، يوضع مصل حاوي على الاضداد في الحفرة الوسطية ومن ثم توضع المستضدات في الحفر الخارجية ، وتحفظ الاطباق في جو رطب ، وفي درجة حرارة الغرفة وبحدود 25 درجة مئوية ولمدة 24–48 ساعة ، ومن ثم يتم الكشف عن وجود الخط الترسيبي.

في حالة ظهور هذا الخط يعني بان هذا المستضد هو لذلك المصل (أي تحديد المستضد من خلال المصل المستعمل لانه الضد يكون نوعي) ، وكذلك يمكن ان يستعمل هذا الاختبار لتحديد العيارية النوعية للضد ، وفي هذه الحالة يتم وضع المستضد في الحفرة الوسطية ومن ثم يوضع المصل في الحفر الخارجية ، وفي حالة تحديد العيارية ، يتم عمل تخافيف من ذلك المصل ومن ثم يوضع جزء من هذه التخافيف في كل حفرة (أي كل تخفيف في حفرة) ، وفي حالة ظهور الخط الترسيبي فان ذلك دليل على حدوث التفاعل ما بين الاثنين.

ملاحظة يفضل دائماً استعمال مصل موجب ومصل سالب مع المصول المراد التحري عن هويتها او لقياس كمية الاضداد فيها.

التلازن (Agglutination)

عند خلط مصل دم لشخص مصاب بالسالمونيلا مع عالق للبكتريا المسببة لهذا المرض ، فأن البكتريا سرعان ما تلتف ببعضها وتكون كتل ترى بالعين المجردة ترسب في قعر انبوبة الاختبار ، كذلك عند حقن أي حيوان باي بكتريا فأن المصل سيكون قادراً على تلزين (Agglutinate) هذه البكتريا ويطلق على هذا التفاعل بالتلازن وتسمى الاجسام المضادة الملزنة بالـAgglutinins.

انواع التلازن

هناك عدة انواع من تفاعلات التلازن مصنفة على عدة اسس:

–نوع التفاعل ، سواء اكان تفاعل مناعي او غير مناعي.

–نوع المستضد المستعمل ، سواء اكان بكتريا ام خلايا دم حمر .

–طريقة اجراء الفحص ، سواء اكان يجري الفحص في قناني اختبار او اطباق المعايرة الدقيقة (Microtiteration plates او على شرائح زجاجية.

التلازن الدموي غير المباشر (Passive Haem Aggl. Test)

قد تستعمل كريات الدم الحمر للانسان او الحيوانات كناقل للمستضدات الذائبة المختلفة وذلك لسهولة ملاحظة التفاعل المناعي على هذه الجزيئات الكبيرة ولتوفرها بشكل كبير ، حيث يرتبط المستضد (بروتين او هرمون من انسان او بكتريا او مستخلصات بعض انواع البكتريا او الطفيليات او أي مستضد اخر) على سطح الخلية الحمراء ، اما بشكل تلقائي (حيث ان للخلايا الحمراء الرغبة في الالتصاق ببعض انواع الـPolysaccharide بشكل تلقائي او ببعض البروتينات بعد معادلة الخلايا الحمراء بالـTonnie) او بربطها بشكل كيميائي عن طريق اواصر مساهمة حيث يصبح المستضد كجزء ثابت على سطح الخلية الحمراء ، ويمكن من خلاله تحديد وجود الاجسام المضادة المتلزنة لهذه المركبات ، كذلك يطلق على هذا النوع من الفحوصات بالتلازن الدموي غير المباشر وذلك لان الفحص يجري بشك غير مباشر على سطح الخلية الحمراء ، هذه الطريقة معتمدة ايضاً عند ربط المستضد على بعض اللدائن الصناعية مثل Latex ، Polystyrere ، Bentonite ، حيث تعمل هذه الجزيئات كناقل للمستضد ويجري التفاعل المناعي على سطحها ليكون تلازن بين الجسم المضاد وبين المستضد المثبت عليها ، وهناك العشرات من الفحوصات التي تستعمل للكشف عن وجود الاضداد لانواع مختلفة من المستضدات سواء اكانت بكتريا او مواد بايولوجية كالهرمونات ويطلق على هذا النوع من التفاعلات بالـ Latex Agglutination.

قد يكون التفاعل غير مناعي ، اذ ان هناك بعض الفايروسات التي لديها القدرة على تلزين خلايا الحمراء للدواجن وبعض انواع اللبائن ، ومن هذه الفايروسات هو فايروس النيوكاسل والحصبة (Measles) وجدري الدجاج (Fowl Pox) ، هذه الفايروسات تكتل خلايا الدم الحمر وبشكل يتناسب طردياً مع كمية الفايروسات المخلوطة مع خلايا الدم الحمر ، إذ يمكن بهذه الطريقة حساب عيارية او كمية الفايروسات الموجودة في نموذج الدم من خلال تخفيفها ومنها درجة التلزين لكمية ثابتة من الخلايا الحمر للدواجن في فحص يطلق عليه بـ Haemagglutination ويختصر الى HA ، ويمكن عكس التفاعل لكي يقيس وجود الاجسام المضادة تجاه فايروس معين وذلك بخلط تخافيف متسلسلة للمصل المطلوب فحصه مع اقل كمية ملزنة من الفايروس بوجود حجم قياسي لخلايا الدم الحمر ويمكن بذلك حساب اعلى تخفيف من المصل يمكن ان يمنع حصول تلازن الفايروس لخلايا الدم الحمر ويطلق على هذا الاخير بـ Haemagglutination inhibition ويختصر الى HI ، ويتخذ هذا التخفيف لحساب عيارية الاجسام المضادة في النموذج المصلي.

فحص تثبيط التلازن الدموي غير المباشر

Passive Haemagglutintation Inhibitor Test

وكما هو الحال مع تفاعل تثبيط التلازن الدموي باستعمال الاجسام المضادة في التحاليل السابقة ، امكن استعمال فحص التلازن الدموي غير المباشر لغرض قياس وجود تراكيز قليلة جداً من المستضد قد تصل الى بضعة نانوكرامات من المادة.

خطوات العمل المتبعة في قياس او فحص تقدير المعيار الحجمي للاضداد الموجهة ضد النيوكاسل (ND):

يطلق على هذا الفحص HI test ويجرى هذا الفحص لقياس المعيار الحجمي(titer) ، ويعرف titer على انه مقلوب اخر تخفيف يظهر تفاعل موجب مع المستضد ، والخطوات هي :

1. يتم سحب 1-2 مل من الدم سواء كان من القلب او من الوريد العضدي في الجناح او عند الذبح وتفصل المصل 2000 دورة دقيقة لمدة 10 دقائق او يترك الدم في الانابيب ليتجلط ومن ثم يتم فك الخثرة عن جدار الانبوبة ويحفظ في الثلاجة وفي اليوم التالي نحصل على مصل.
2. يتم تحضير Microtiter plate اطباق المعايرة الدقيقة (وهي عبارة عن اطباق تحتوي على حفر بمقدار 96 حفرة) على شرط ان تكون قعر هذه الحفر بشكل حرف U باللغة الانكليزية وليس حرف V وهذه الاطباق مصنوعة من مادة الدائن poly staire.
3. يتم نقل 50 مايكروليتر (0.05 مل) على خط من خطوط الـــplate اي 12 حفرة ما عدا الحفرة الاولى من مادة PBS (phosphor buffe sline) حيث توضع فيه 80 مايكروليتر ومن ثم يضاف 20 مايكروليتر من المصل الى الحفرة الاولى بواسطة مايكروبايبيت micro pipate وبذلك يصبح حجم المحلول في الحفرة الاولى 100 مايكروليتر حيث يتم سحب المحول وارجاعه الى الحفرة عدة مرات لكي نؤمن بان المادتين قد اختلطت بصورة جيدة وفي هذه الحالة تم تخفيف المصل الى 5/1 وان الحجم الكلي داخل الحفرة 100 مايكروليتر وفي بقية الحفر 50 مايكروليتر من محلول BPS فقط.

او يكون التخفيف بالشكل التالي

1. بعد مزج محتويات الحفرة الاولى يتم نقل 50 مايكروليتر منه الى الحفرة الثانية وفي الثانية تخرج جيداً وتنقل 50 مايكروليتر الى الثالثة وهكذا في الرابعة والخامسة وتهمل 50 مايكروليتر الاخيرة بعد التخفيف في الحفرة 12 ويمكن عمل تخفيف ثنائي او تخفيف عشري (two fold dilution) or (ten fold dilution).
2. حيث يتم نقل 50 مايكروليتر من محلول عالق فايروسي ND يحتوي على 4HA unit ويوضع في كل حفرة واحدة تلو الاخرى حيث كل واحدة تحتوي على واحدات تلازنية وبذلك تصبح مجموع المحلول 100 مايكروليتر وتوضع في حاضنة بدرجة 37°م ولمدة ساعة واحدة على

ان تحرك 5 مرات لليمين و 5 لليسار اي حصلنا على Antibody Antigen وخلال هذه الفترة سوف يتعادل الفايروس مع الاجسام المضادة الموجودة في مصل الدم ان وجدت ولكننا لا نستطيع ان نرى ما حدث في هذا المحلول فنحتاج الى كاشف يظهر لنا درجة هذا التعادل وبذلك يعكس تركيز IgS في Antibody الجسم.

3. يضاف 50 مايكروليتر من الكاشف وهو عبارة عن عالق كريات الدم الحمر للدجاج وبعد ذلك تترك الـplate لمدة ¼ ساعة، وتؤخذ القراءة بعد ذلك ويفضل ترك حفرة اخيرة للسيطرة توضع فيها كل المواد السابقة ما عدا الفايروس (لقاح ND) وعند ملاحظة حصول ترسيب للكريات الدموية في هذه الحفرة بشكل كامل يؤخذ القراءة مباشرة.

كيفية القراءة: ان مبدأ هذا الفحص يستند الى ان فايروس من ND يحتوي على اشواك Spikes وان هذه الاشواك او البروزات تعمل على تلزين لكريات الدم الحمراء Agglutination RBS ولهذا فان وجود الفايروس سوف يعمل ما يشبه الحلقة يطلق عليها Mate وبذلك يمنع الخلايا من ان تترسب بشكل نقطة في السيطرة وفي الحفرة الاخرى عند اضافة فايروس يكون بالشكل التالي:

Titer: هو مقلوب التخفيف، اذن في الحفرة الاولى ومع وجود تركيز عالي للـAntibodies فان الاجسام المضادة قد غطت الاشـــواك spikes ومنعته من تلزين كريات الدم الحمراء Agglutinations وبذلك يطلق على هذه الطريقة تثبيط التلزين Agglutination نوع من التلقيح المتبع هو ثنائي two fold dilution والدقةفي الثنائي اضبط (اكثر) دقة.

ملاحظات خاصة: شروط فحص تقدير الاضداد الموجهة ضد النيوكاسل:

1. تكون الطبق plate من النوع المقعر U.
2. يكون عالق كريات الدم الحمراء جديد لا يزيد عمره عن 4 ايام كحد اعلى وذلك لان هذه الكريات تتحلل hemolysis ويجب حفظ المحلول العالق في الثلاجة بدرجة 4°م.
3. يتم قراءة النماذج بوقت قصير او محتدد وهو الوقت الذي يحدد وفق حفرة السيطرة علماً بان القراءة سوف تتغير بعد فترة وجيزة لان الفايروس يحتوي على انزيم neuraminidase وان هذا الانزيم سوف يفك ارتباط كريات الدم الحمراء ويترسب.

فحص التلازن الدموي Heam agglutination test (Ha test)

يستخدم هذا الفحص لمعايرة اللقاحات وذفلك لايجاد تخفيف العمل working dilution للحصول على اربعة وحدات تلازنية من محلول الفايروس HA

خطوات الفحص:

1. يتم جلب انبوبة لقاح من شركة كندي مثل لقاح lasota.
2. يضاف لها 3 مل من محلول PBS.
3. يتم اخذ Micro titer plate ويتم وضع 50 مايكروملتر من PBS في كل حفرة ما عدا الحفرة الاولى فتوضع 80 مايكروليتر PBS.
4. نعمل تخفيف للعالق الفايروسي حيث نضيف 20 مايكروليتر في الحفرة الاولى ومن ثم نعمل خلط وتنقل 50 مايكروليتر وهكذا كما في الطريقة السابقة في كل حفرة.
5. يضاف 50 مايكروليتر من عالق كريات الدم وفي كل الحفر ما عدا الحفرة الاخيرة وتكون للسيطرة.
6. ثم يتم ترسيب الكريات بعد ¼ ساعة ويظهر الفحص بشكل اني حيث سيكون التلازن بالعكس عما هو عليه في الفحص الاول حيث تكون الحفرة وبعد تحديد الـtiter وهو مقلوب اخر تخفف يتم تقسيم الرقم على 4 واذا كان الـtiter 1280 ان هذا الرقم يعني ان هذا العالق الفايروسي يجب تخفيفه بقدر 320 مرة لاجل استخدامه في الفحص الاول HI فلو اخذ هذا العالق 20 مايكروليتر سوف نضيف اليها بمقدار 20×320=6400 مايركوليتر من PBS=6.4 مل اي 20 ميارکولیتر تضاف الى 6.4 مل PBS حتى نحصل على تخفيف العمل في فحص HI ان هذا التخفيف للعالق المحضر بهذا الشكل هو العالق الفايروسي المحتوي على 4 وحدات تلازنية والغرض من هذا العمل لضمان كمية الفايروس متساوية في كل الفحوصات اي Titer مضبوط علماً ان في كل شركة لها titer معين تستعمل نفس الطريقة وتقسم على 4 ويظهر الناتج مضبوط.

تحضير عالق الكريات

يتم سحب دم من افراخ غير ملقحة بالنيوكاسل ND ينقل 2 مل من الدم الى انبوبة اختبار حاوية على مانع التخثر مثل محلول 1% EDTA او محلول 4% سترات الصوديوم او الهيبارين، تؤخذ الدم من الوريد الجناحي وتوضع في جهاز الطرد المركزي center fuge حيث يلاحظ طبقة من كريات الدم البيضاء WBC على السطح حيث يهمل الراشح ويؤخذ راسب الكريات ويغسل بمحلول 2 مل من PBS وتوضع في جهاز الطرد المركزي ويهمل الراشح وهكذا تعاد الطريقة ثلاث مرات وبعد ذلك ينقل من الراسب (RBC) 0.1مل الى 10مل من PBS وذلك ليتم تحضير عالق التركيز 1%. ومن هذا المحلول سوف يتم استخدام عالق الكريات لفحص HI و HA.

تحضير محلول داريء الفوسفيت PBS:

يتم اذابة المواد التالية في 1 لتر (1000 مل) ماء مقطر D.W:

[85 غم NaCl + 0.2 غم KCl + 1.15 غم Na_2HPO_4 (di sodium hydrogen phosphate) + 0.2 غم kh_2po_4 (potassium dihydorgen phosphate)].

ولاجل حفظ هذا المحلول ووقايته من التلوث المايكروبي واطالة فترة خزنه يفضل اضافة 1 غم من مادة Na-azide لكل لتر واحد من المحلول الفسيولوجي PBS، واذا كان المحلول Na-azide بشكل محلول فيضاف 1 مل/100 مل من المحلول.

تحضير محلول ملح الصوديوم (normal sline):

كل 100 مل ماء مقطر D.W يضاف له 0.85 غم pure NaCl (او 85 غم NaCl/1لتر ماء مقطر).

تحضير محلول Na-azide:

يضاف 1 غم من Na-azide/100 مل من المحلول الملحي الفسيولوجي PBS.

تحضير مانع التخثير Ethelen Diamide Tetra Acitic Acid EDTA

يضاف 1 غم من مادة EDTA/100مل من ماء مقطر D.W والكمية المستخدمة1 مل ليصبح التركيز 1% ويفضل تدوير الانبوبة عدة مرات. او يستخدم 4% صوديوم ستريت sodium citrate ويحضر 4 غم من المادة/100 مل ماء مقطر D.W اي بتركيز 4%.

ملاحظة: موانع التخثر قد تؤثر على بعض صفات الدم لذلك يراعى عند استخدام اي مانع تخثر نوع الفحص المستخدم.

قياس المعيار الحجمي المستخدم لمرض الكمبورو GD:

لا يحتوي الكمبورو على اشواك ولذلك لا يمكن فحصه بفحص HI ولذلك يتم الفحص بالترسيب بالهلام (Agar gel prectipitation) AGP test.

وفي هذا الفحص يتم عمل طبق من الهلام ويتم عمل حفر في هذا الطبق ويجري الفحص كما في الخطوات التالية:

1. حيث تعمل حفر بشكل دائري وحفرة مركزية في الوسط مع مراعاة المسافات تكون متساوية بين الحفر.
2. يتم عمل تخفيف تلازني للمصل في طبق المعايرة الدقيقة حيث توضع في الحفرة الاولى مثلاً 50 مايكروليتر serum و50 مايكروليتر PBS في الحفر الاخرى. نضع 50 مايركوليتر PBS ويتم نقل 50 مايكروليتر من كل تخفيف الى حفرة من الحفر micro titer plate ومن ثم تنقل 50 مايكروليتر من كل حفر الى الحفر الطبقية مع ترك الحفرة الاخيرة control للسيطرة وتوضع PBS فقط.

وفي الوسط توضع Antigen (عالق الفايروس المأخوذ من غدة فابريشيا Bursa للافراخ المصابة سابقاً) ويعتمد هذا الفحص على انتشار المصل مع Ag، فعند انتصاف المسافة بينهما فيكون خط ترسيب.

تحضير جل Agrose

يتم تحضيره بمقدار 1.5 غم من هلام Agrose ويضاف له 4 غم من NaCl ثم يكمل الحجم الى 100 مل بماء مقطر ولاجل الحفاظ على المحلول يضاف له Na-azide بمقدار 0.1 مل/1 مل من الهلام. تسخن هذه المحتويات على هيتر لكي يتم اكمال ذوبان الهلام عند غليانه يتم رفعه وينتظر حتى تنخفض درجة حرارته ˚55م (دافئ) ثم يتم صب الهلام في اطباق بتؤي بمعدل 15 مل/طبق. الهلام الفائض يبقى بالبيكر وتوضع في الثلاجة الى حين الاستخدام اللاحق علماً ان الهلام عندما يبرد يتصلب وعندما يراد استخدامه يجب اذابته مرة اخرى على النار وتتكرر العملية.

نقوم بعمل ثقوب داخل الهلام ثقب مركزي ويحيط به ثقوب على محيط الدائرة، يوجد الة خاصة تسمى pangors او يمكن استخدام النهاية الاخرى لاي ماصة pipet ويدخل الجل gel بها على ان يراعى تساوي المسافات بين الحفر ثم ترفع مناطق الـgel داخل الحفرة بواسطة عود ثقاب.

نقوم بتخفيف المصل بـــmicro titer plate نضع في كل حفرة 50 مايكروليتر PBS ثم نضع 50 مايكروليتر serum بالحفرة الاولى وبعد السـحب والضـخ (3–4) مرات ينقل 50 مايكروليتر الى الحفرة الثانية والثالثة...الخ وبذلك يكون التخفيف 16/1 يمكن التركيز بعملنا.

وبعد ذلك نقوم بنقل 50 مايكروليتر من كل تخفيف الى حفرة من الحفر الجانبية اما الحفرة الخامسة فتوضع بها مصل serum موجب s^+ positive serum اي مأخوذ من دجاج مصاب بمرض الكمبورو بحيث نضمن وجود (Ab) Antibody موجبة ضد فايروس الكمبورو 100%. يستخدم هذا المصل للتأكد من صلاحية Ag العالق الفايروسي الذي يوضع بالفحص.

الحفر 6 يوضع فيها 50 مايكروليتر PBS يعني ماء فقط لضمان عدم حصول خط ترسيب. الحفرة الوسطية يوضع فيها 50 مايكروليتر من Ag اي من العالق الفايروسي الخاص بفايروس الكمبورو، يحضر العالق عن طريق اخذ Bursa من طيور مصابة بالمرض تطحن هذه الـBursa بعد التقطيع الناعم تطحن بجفنة خزفية وبها هاون مع وجود كمية من الرمل المغسول لغرض تكسير الخلايا يضاف 2 مل PBS ثم بعد ذلك تجمع وتوضع بجهاز الطرد المركزي لغرض ترسيب المحتويات واخذ الطافي الذي يحتوي على الفايروس، توجد في المختبرات طاحونة زجاجية بها زجاج خاص لسحق الخلايا لخروج الفايروس بالعالق.

ان الهلام في هذا الفحص سوف يكون وسط لانتشار جزيئات Ag (فايروس) والاجسام المضادة Antibodies (بروتينات مناعية) موجهة او متخصصة وعندما يلتقي الجسم المضاد Ab مع الانتجين Ag سوف يترسب ويكون معقد الانتجين مع الجسم المضاد Antibody-Antigen complex يظهر كخط ترسيبي بعد ان يترك الطبق في وسط رطب يطلق عليه Humid chamber وعند عدم وجوده يتم الاستعاضة عنه وذلك بوضع الاطباق في طبق زجاجي بها قاعدة ويسمى Dececator يوضع في الحاضنة بدرجة 37°م لمدة (2–3) يوم وثم يقرأ الناتج. ولضبط النتائج يفضل نقل الاطباق الى الثلاجة ويبقى لمدة اسبوع.

النتيجة تعتبر موجبة اذا ظهر خط راسب مستقيم ابيض، الخط بين الحفرتين وسط المسافة.

Titer الذي لا يعطي خط هو الذي يعطي نتيجة موجبة حيث نأخذ مقلوب التخفيف له والذي هو الـــTiter المطلوب.

فحص الأليزا ELISA test

وهو عبارة عن فحص دقيق جداً يستخدم لمعايرة اي فايروس او انتجين ويقاس لمعايرة Titer حيث يستطيع هذا الفحص بالتحسس بمقدار 0.0005 مايكرومل (5 لكل 10 آلاف) لذا فانه كثير الدقة، في حين الفحص HI 10/1 وفي HA 100/1 وفي فحص الـAgar 30 ملغم/مل.

ويجري الفحص حسب ما يشير اليه المصدر:

Development of specific ELISA antibody G.M and A Monoclonal Antibody 1997, poultry science. 76: 302-310.

ان هذا الفحص من الفحوصات الحديثة وان كلمة ELISA هو مختصر:

Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

ويجري ضمن الخطوات التالية:

1. خطوة لصق الانتجين على سطح الـــplate داخل الحفر حيث هناك plates خاص بالالايزا علماً بان الـــplate الخاص بالالايزا تصنع من مادة بولي ستايرين وان الانتجينات سوف تلتصق بها التصاق كهربائي hydrophoby

ويحضن الـplate بالحاضنة لمدة 24 ساعة وبعد ذلك يتم غسلها بالماء او بالمحلول Tween-20 لاجل رفع كل الانتجينات المرتبطة بها.

2. خطة اضافة المصل يتم عمل اضافة المصل كما في السابق ويحتوي المصل على Antibody Ab ضد الانتجين حيث يلتصق Antibody مع Antigen على الجدار وبعد ذلك يتم غسل الـplate مرة اخرى لازالة المواد الغير مرغوبة. الى هذه الخطوة لا نعرف ان Antibody ارتبط بالـAntigen ام لا.
3. خطوة اضـــافة المقترن conjugate والمقترن عبارة عن اجســـام مضـــادة موجهة ضـــد الاجســـام المضـــادة الاولى ومربوط معها انزيمات معلمة كما في فحص الايزا وهذه الانزيمات معلم بـ(Horse Radish peroxidase (HRP او (Alkalin phosphate (Ali او تستخدم مواد مشعة (Radio Immuno Assay (RIA او مواد تألقية عند فحص التألق المناعي (Immuno Florecence Assay (IFA بحيث يمكن من هذه المواد تكبير حجم المواد المشـعوعة للارتباط سـوف تتألق تحت اشـعة الشـمس. ويحضـر المقترن عن طريق حقن الاجسام المضـادة الاولى ولتكن chicken Ig بحيوانات تجريبية مثل الارنب لاسـتخراج المضـاد Antibody حيث يحقن الارنب في منطقة الظهر (2-3) مرات يومياً ولمدة 2 اسـبوع، ثم يسـحب الدم بعد (14-20) يوم من الاذن لاجل عزل Isolation rabbit Antichicken لاجل عزل او الحصـــول على البورتينات المناعية Immuno globulines وبعد ذلك تعلم هـذه البروتينـات بفحص ELISA بـانزيمـات المســـتخـدم (Horse Raddish peroxidase (HRP او (Alkaline phosphate (Ali، ولحد الان لاتسـتطيع ان ترى الاشـارات المبعوثة او ارتباط الاجسـام المضـــادة فنحتاج الى خطوة لرؤية الاجسام المضادة.
4. اضـــافة مادة الحلية (الركيزة) substrate وهي المادة التي يعمل عليها الـــــenzym ففي حالة انزيم Horse Raddish peroxidase يســتعمل مادة (ortho phenyl Diamide (OPD ان هذه المادة عديمة اللون ولكن بعد ان يعمل عليها الـــــenzym ســوف يحلولها الى مـادة بنيـة اللون يمكن قيـاســـهـا بواســـطـة جهـاز Spectrophotometer الخاص بفحص الايزا.
5. ومن الطرق الحديثة للالايزا يتم ربط Ab و Ag و conjugate حيث يتم ربط الـAntibody (Ab) اولاً ومن ثم Antigen (Ag) وفي الاخير المقترن conjugate وبذلك يسمى sandwich ELISA.

طرق قياس المناعة الخلوية

1. **طرق القياس على الحيوان نفسه Invivo method**

توجد تفاصيل لهذه الطريقة بالمصادر التالية:

- Contanious Hyper sensitivity ihn chicken, selected to (Ab) Antibody response to (SRBC), 1993m poulry science 72: 1674-1692.
- Evalution of cell mediated Immunity in yong chicken 1991, poultry science 69: 403-407.

تستخدم في الحقول او البحوث تلقيحات النيوكاسل والكمبورو بصورة عادية لهذا سوف نضمن ان هناك تحسس للخلايا المناعية ضـد هذه الانتجينات Ags، بعض البحوث يستخدمون Ag حامل entart مثل كريات الدم الحمر للخراف SRBC حيث يتم حقن الطيور بهذه الانتجينات Ag وبعد فترة حوالي 10 ايام تظهر الاستجابة المناعية (خلطية و خلوية) سوف يمكن دراسة المناعة الخلوية.

وعندما نريد قياس المناعة الخلوية تقوم بتعريض الجسم للـــAg لنفرض فايروسات النيوكاسل او الكمبورو حيث يتم حقن 20 مايكروليتر من عالق Ag في منطقة خالية من الريش اي في منطقة العرف COMB او الدلايات Wattels وفي الافراخ الصـغيرة يتم الحقن بين الاصـبعين الثاني والثالث للرجل او الشـغاف الموجود في طية الجناح. وقد يطلق على الفحص اسم اختبار فحص فرط الحساسة العاجل Delate typer Hyper sensitivity.

وبعد حقن 0.1 مل من الـــــAntigen في الدلاية (يجب ان لا يقل عن 1000 مايكروغرام من Ag) ويحقن الـــدلايـــة الـــثـــانـــيـــة بـــــــــــPBS (phospho buffer sline) بـــعـــد (24–48) ساعة ثم يقاس سمك الدلاية الاولى والثانية ثم يستخرج سمك الدلايات النسبي الذي يستخرج من المعادلة:

سمك الدلاية = Tr-TL الاولى
TL

ان ما يمكن حدوثه في منطقة الفحص بعد دخول الـــAg حيث تدخل هذه المنطقة في طور الاستجابة فتهجم الخلايا المناعية فتتورم المنطقة ويزداد سمكها تبعاً لقوة الالتهاب بينما اذا لم يوجد التهاب لا يحدث تضخم بالمنطقة.

2. طريقة الفحص المختبري Inbetro method

قد يطلق عليه فحص الدليل التحفزي stimulation index، او فحص التحول اللمفي lymphoid test ويعتمد هذا الفحص على ان الخلايا اللمفاوية المتحسسة للانتجين Ag سابقاً سوف يكون متحفزاً او سريع الانقاسامات الخلوية، ولذلك عند تحفيزها بالمشطرات mitogen سوف تبدأ بالانقسامات الخلوية بسرعة اكبر من الخلايا غير المتحفزة وهي عبارة عن محفزات نباتية مثل:

Phytohemagglutinine (PHA)
Conavallin-A, (Con-A)
Lipopoly saccharides (LPS)

ويمكن الكشف عن هذه الانقسامات السريعة من خلال تعليم بعض المواد التي سوف تستخدمها هذه الخلايا لصنع DNA او RNA مثل القواعد النتروجينية البرميدين والبيورين وبالتالي يمكن ملاحظة المادة المشعة معلمة تحت المايكروسكوب او ملاحظة الخلايا بطرو الانقسامات بصورة مباشرة.

ملاحظة: الحنطة تحفز الكلوستريديا وتؤدي الى حدوث مرض التهاب الامعاء التنخري ويجري الفحص بالخطوات التالية:

1. عزل الخلايا اللمفاوية: بعد سحب الدم وبوجود مانع التخثر ومحلول خاص يدعى Lymphoprib سوف تبقى الخلايا اللمفاوية بالاعلى ثم تنقل هذه الطبقة لاطباق معايرة مطابقة تحتوي على اوساط زرعية هو الوسط RPA Index media و Hit solution (سائل ملائم).
2. ثم يضاف له المشطرات لتبدأ الخلايا بالانقسامات لذلك تحتاج الخلايا الى تصنيع DNA و RNA فلو تم تعليم هذه النيوكليوتيدات بمادة معينة فان هذه المواد المعلمة سوف تنسحب الى داخل الخلايا ويمكن اضافة هذه المواد للوسط بعد تعليمها بمادة ومضية او مشعة ثم تحسب تحت المجهر 100 خلية Lymphocyte وكم خلية لمفاوية دخلها المادة المشعة او الومضية اي يعني كم خلية حفزت على الانقسام لذا يطلق على هذا الفحص فحص التحفيز stimulation index. عندما تكون المناعة عالية يحصل هلا تحسس عالي اما اذا كانت المناعة قليلة يكون التحسس قليل.
3. وعند عدم وجود هذه الاجهزة من الممكن تكسير الكريات اللمفاوية Lymphocyte عن طريق اخذ قطرة تقطرعن بعد على السلايد حيث تتكسر القطرة، وبعد جفاف القطرة الساقطة تصبغ، ويمكن حساب 100 خلية لمفاوية واستخراج او حساب عدد الخلايا التي في طور الانقسام الخلوي Mitosis، لذا يطلق على هذا الفحص فحص دليل التفتت Miototic index.

المناعة ضد الفايروسات (Immunity to Viruses)

الفايروسات او ما يطلق عليها بالحمة هي عبارة عن دقائق تعيش بشكل مجبر داخل الخلايا التي تقوم باصابتها ، وهذه الدقائق لا تستطيع التكاثر خارج الخلايا الحية وذلك لعدم استطاعتها القيام بجميع الافعال الحيوية اللازمة لصناعة البروتينات

او الطاقة اللازمة لهذه الافعال ، كذلك فأن هناك بعض الانواع من الفايروسات لا تملك حتى بعض الانزيمات اللازمة لعملية تصنيع الاحماض النووية وبذلك تعتمد على خلايا المضيف للقيام بجميع الافعال الحيوية.

جزيئة الفايروس الفعالة والتي يطلق عليها بجسم الفايروس او الـVirion هي الجزيئة الناضجة او الكاملة للفايروس والتي تعتبر العامل المسؤول والمسبب للعدوى ، تتكون هذه من حامض نووي واحد قد يكون DNA او RNA وتكون محاطة بغلاف بروتيني يطلق عليه بالـCapsid وهذا يتكون من جزيئات بروتينية تسمى بالـCapsomere ، وكذلك فان هناك بعض الانواع من الفايروسات قد تكون محاطة بغلاف (Envelope) اضافة لذلك هناك انواع من الفايروسات قد تحتوي على ما يطلق عليه بالنتؤات (Spikes).

تعتمد المقاومة او المناعة ضد الفايروسات على نوع الفايروس وقابليته على اصابة الخلايا ، ولكن بشكل عام يمكن ان تصنف المقاومة ضد الفايروس الى :

1.مقاومة غير نوعية (Non specific Immune Response)

وتكون متمثلة بالدفاعات الذاتية التي قد يحتويها الجسم والتي تعتبر الخط الدفاعي الاول ، وهي جلد والاغشية المخاطية اضافة الى الافرازات العرضية والمخاطية والـLysozyme ، كما ان الدم يحوي على العديد من هذه المواد التي تعمل بشكل غير نوعي مثل المتمم والانترفيرون ، وهذا الاخير يعد من العوامل الاساسية غير النوعية التي لها اثر كبير في عملية القضاء على الفايروس.

الانترفيرون بشكل عام عبارة عن مجموعة من البروتينات ، وقد اكتشف لاول مرة عام 1957 كمواد مضادة للفايروس ، ويصنف الانترفيرون في الانسان والفئران الى ثلاثة اصناف رئيسة هي :

1.انترفيرون الفا (Alpha- Interferon) ويرمز له بـalph IFN

ينتج من قبل خلايا T و B وخلايا Macrophage ، ويقوم بتنشيط الخلايا الاخرى وخاصة الخلايا القاتلة الطبيعية (NK) للتخلص من الاصابات الفايروسية.

2.انترفيرون بيتا (Beta-IFN) ،يتم إنتاجه من خلايا Fibroblast

يتصف النوعان الفا وبيتا بخاصية ثبوتهما بالمحيط الحامضي وكذلك لدرجة الحرارة

3.انترفيرون كاما (Gama-IFN)

هذا النوع ينتج من قبل خلايا T وخلايا القاتلة الطبيعية (NK) ، ويقوم بتنشيط خلايا مناعية اخرى وبالذات خلايا T السمية ، ويمتاز بتأثرها الكبير بالوسط الحامضي وبدرجات الحرارة.

الانترفيرون بانواعه الثلاثة يمكن ان ينتج عن طريق تحفيز خلايا T وذلك باستعمال اما الفايروسات الحية او المقتولة او باستعمال البكتريا او بعض المواد وخاصة الانترفيرون كام ، حيث يمكن انتاجه بتحفيز الخلايا بمادة PHA (Phytohaemoaglutinin) والتي تعتبر احد انواع المشطرات (Mitogens).

يعمل الانترفيرون على حماية الخلية من الفايروسات بالطريقة الاتية:

بعد دخول الانترفيرون الى الخلية غير المصابة فأنه يمنع كبت الـDNA cistron الخاص بالخلية لتكون mRNA الخاص ببروتين يدعى بـ Translate Inhibitory Protein (TIP-mRNA) ، يرتبط الـ TIP-mRNA مع الرايبوسومات ويؤدي الى انتاج الـTIP وتجمعه هناك.

ماهي المشطرات (Mitogens)

هي عبارة عن احد انوع المستضدات والتي لها القدرة العالية على تحفيز نسبة كبيرة من الخلايا اللمفاوية لانواع متعددة من الحيوانات ، وتستعمل هذه المشطرات لتحفيز الخلايا في انابيب الاختبار (*in-vitro*) وذلك لدراسة الفعاليات الحيوية التي تحصل بعد التحفيز.

ان القدرة التحفيزية للمشطرات ليست لها علاقة بقابليتها الاستضدادية ، وهذه المواد تتمكن من تحفيز ليس مجموعة واحدة من الخلايا وانما عدة مجاميع (Polyclonal) بغض النظر عن طبيعتها الاستضدادية ، ولا ترتبط المشطرات بالمستقبلات الخاصة بالمستضد الموجود على اسطح الخلايا اللمفاوية ولكنها ترتبط بالكاربوهيدرات الموجودة في كل الخلايا اللمفاوية ، ومع ذلك فليست كل المشطرات غير خاصة ، حيث لوحظ ان بعضها يحفز خلايا T بينما البعض الاخر يحفز خلايا B اللمفاوية.

أ-المشطرات المحفزة لخلايا T اللمفاوية

وجد بان بعض المشطرات تحفز فقط خلايا T اما خلايا B فلا تتحفز بها الا بصورة غير مباشرة عن طريق خلايا T المساعدة التي تكون قد تحفزت بالمشطر المذكور مسبقاً ، ان اهم هذه المشطرات المستعملة في هذا الجانب هي الملزن الدموي النباتي والذي يطلق عليه بـConcanvalin-PHA ويختصر الى Con-A او يسمى بـPhytohaemagglutinin ، وتم عزله من نوع من الفاصوليا تسمى بـKidney Bean عام 1955 ، ولوحظ ان 80% من الخلايا اللمفاوية تتحول الى خلايا لمفوبلاست بعد تعريضها لهذا المشطر بفترة زمنية تصل الى يومين او ثلاثة ايام ، ولكن النسبة الحقيقية للخلايا اللمفاوية المحفزة قد لا يتعدى 50% ، ويختلف هذا الرقم بطبيعة الحال اعتماداً على نوع المشطر المستعمل وطبيعة الخلايا اللمفاوية T او B.

2-مقاومة نوعية (Specific Immune Response)

تتمثل بتحفيز الجهاز المناعي وتشمل المناعة الخلوية والخلطية.

أ-المناعة الخلطية

بما انه الـCapsid متكون من مادة بروتينية فلهذا فهو يعتبر محفز جيد للجهاز المناعي وبذلك يقوم الجهاز المناعي بانتاج الاجسام المضادة ، وتقوم هذه الاجسام المضادة بالتعادل مع جزيئة الفايروس ، كذلك تعتبر الاجسام المضادة العامل الرابط في عملية مهاجمة الخلايا المصابة بالفايروس بالخلايا القاتلة.

ب-المناعة الخلطية

ففي حالة الفايروسات التي تتكاثر بواسطة التبرعم تعد المناعة الخلوية هي الاساس ، حيث تقوم خلايا T السمية بمهاجمة الخلايا المصابة ، كذلك فان الخلايا القاتلة الطبيعية تقوم بالتصدي للاصابات الفايروسية بشكل تلقائي وبذلك يمكن التخلص من الاصابة حتى وان كانت جزيئة الفايروس داخل الخلايا.

خطوات الاصابة بالفايروس

لكي تحدث الاصابة المرضية بالفايروسات لابد ان تحدث سلسلة من الخطوات وحسب التسلسل الاتي :

1.الالتصاق (Atachment)

لابد للفايروس ان يلتصق على سطح الخلية المستهدفة (Target Cell) سواء في الجهاز التنفسي او الهضمي ، يحدث الالتصاق نتيجة لتطابق المستقبل (Receptor) الموجود على سطح الخلية المستهدفة مع المستقبل الموجود على مظلة الفايروس وهي البروزات (الاشواك) الملزنة لكريات الدم والتي يطلق عليها اسم Heamagglutinin ويرمز لها بالرمز H (كما هو الحال في فايروس انفلونزا الطيور) ، عندما يتطابق شكل البروتين الموجود في المستضد H للفايروس مع شكل المستقبل البروتيني ايضاً الموجود على سطح الخلية فأن الاصابة ستحدث.

اما اذا لم يحصل تطابق فأن هذا يعني ان هذا الفايروس سوف لا يستطيع ان ينفذ الى داخل الخلية هذه ، لذلك فأن نوع المستضد H هو الذي سيحدد الخلايا المرشحة للاصابة وان المستضد H هو الذي سيحدد نوع الحيوان المرشح للاصابة ، اذن هذا المستضد هو الذي يحدد هوية العائل (Host) المرشح للاصابة ، التطابق هنا هو نوع من التطابق او التجاذب الكهربائي (Electrostatic) بين الشحنات الموجبة والسالبة المتواجدة على بروتين المستضد H مع البروتين الكاربوهيدراتي (Glycoprotein) الموجود كمستقبل على سطح الخلية.

2.مرحلة الاختراق (Penetration)

الفايروسات كائنات مجبرة التطفل داخل الخلايا ، لذلك لا بد لها ان تخترق جدار الخلية لتدخل الى الداخل ولتسيطر على جميع فعاليات الخلية ، الفايروس بالحقيقة لا يمتلك قدرة على توليد الطاقة لعدم وجود المايتوكوندريا ، ولا يمتلك القدرة على تصنيع البروتينات لعدم امتلاكه للرايبوسومات والشبكة الاندوبلازمية ، ولا يمتلك اجسام كولجي المهمة في تشكيل البروتينات المصنعة ، لذلك على الفايروس ان يدخل لداخل الخلية ليسخر كل محتويات الخلية ويجعلها تحت تصرفه ، عملية الاختراق تحصل عن طريق التحام جدار الخلية مع المظلة الخارجية للفايروس وبذلك تبقى مظلة الفايروس على سطح جدار الخلية اما المحفظة النووية (Nucleocapsid) سوف يحصل لها عملية التهام شبيهة بالتهام الاميبيا ، أي ان الجدار الخلوي سيحيط بالمحفظة ويلتقفها الى داخل الخلية بعملية يطلق عليها اسم Viropexis او Phagocytosis.

3.عملية ازالة الاغلفة (Uncoating)

بعد مرحلة الاختراق ستدخل المحفظة النووية للفايروس الى داخل الخلية لتصبح داخل فجوة (Phagocytic vacules) ، بعد ذلك تجري عملية ازالة الاغلفة حيث ستهاجم المحفظة النووية بالانزيمات الهاضمة المنطلقة من الاجسام الحالة (Lysosomes) الموجود في الخلية ، هذه الانزيمات ستزيد الكابسد (Capsid) المغلف والمحيط بالمادة النووية ، اذ ان بروتينات الكابسد سوف تهضم ليتحرر الحامض النووي RNA ليذهب ويدخل الى نواة الخلية ، وبذلك سوف يسيطر على مركز قيادة الفعاليات الحياتية للخلية.

4.مرحلة الاستنساخ والترجمة (Translating & Transcription)

تحصل عملية استنساخ لجزء من ظفيرة الحامض النووي الـDNA في الفايروسات من نوع DNA وتتحول شفرتها الى شكل RNA المرسل (mRNA) لتذهب الى الرايبوسومات لاجل تصنيع بعض البروتينات الفايروسية بعد ترجمة هذه الشفرة وارسال الـRNA المرسل tRNA لجلب الحوامض الامينية اللازمة لتصنيع البروتين المطلوب ، هذه العملية للاستنساخ والترجمة يطلق عليها اسم عملية الاستنساخ المبكر والترجمة المبكرة ، بعد ذلك يحصل استنساخ وترجمة متأخرة لاجل تصنيع البروتينات الفايروسية الداخلة في تركيب المظلة الفايروسية ، ويطلق على هذه العملية اسم الاستنساخ المتأخر والترجمة المتأخرة ، في الفايروسات من نوع RNA فأن قطعة من قطع الفايروس تعمل عمل RNA المرسل (mRNA) لتذهب الى الرايبوسومات لاجل الايعاز لها بتصنيع بروتين خاص يمثل انزيم مهم للفايروس وهو انزيم RNA Polymerase والذي سوف يستعمل في مضاعفة (Replication) الحامض النووي الرايبي (RNA) ، بعد ذلك تتم ترجمة القطع الاخرى في في الرايبوسومات لتصنيع انواع البروتينات التي سوف يستعملها الفايروس في تصنيع بروتينات الغلاف (Capsid) والمظلة (Envelope).

5.مرحلة تصنيع البروتينات في الرايبوسومات

الشفرة الوراثية (Genetic Code) سوف تصل للرايبوسوم عن طريق الـmRNA لتحدد له تسلسل وانواع الحوامض الامينية الداخلة في البروتين المراد تصنيعه ، الرايبوسوم سوف يعمل شفرة مقابلة (Anti code) على شكل tRNA (RNA الناقل) والذي هو على شكل شريط من القواعد النايتروجينية هي الادنين (A) والكوانين (G) والثايمين (T) واليوراسيل (U) ، كل ثلاثة قواعد نايتروجينية سوف تشفر لحامض اميني واحد ، مثلاً شفرة AAG ستختص بالحامض الاميني اللايسين ، والشفرة AGT تشفر للحامض الاميني الالنين والشفرة GGA تشفر للحامض الاميني المثيونين وهكذا دواليك.

هذه الحوامض سوف تصطف حسب التسلسل المطلوب على رايبوسومات الخلية وسوف ترتبط مع بعضها باواصر ببتيدية (Peptide Linkage) ، بعد ذلك تزحف هذه السلسلة لتدخل الى الشبكة الاندوبلازمية (Endoplasmic Reticulum) ، داخل الشبكة سوف يحصل للسلسلة الالتواء (Folding) ليصبح الشريط من الحوامض الامينية على شكل ملف ملتوي (alpha-Helix) ، هذا الشريط سوف يدخل الى اجسام كولجي ليضاف اليه وحدات اضافية مثل الكاربوهيدرات ليصبح على شكل بروتين كاربوهيدراتي (Glycoprotein) او دهون ليصبح بروتين دهني (Lipoprotein).

6.مرحلة التجمع او التجميع (Assembly)

بهذه المرحلة ستحصل عملية تجميع لمكونات الفايروسات بعد ان تم تصنيعها ومضاعفتها ، ان الحامض النووي RNA سوف يستنسخ داخل النواة ويتضاعف ، وان البروتينات التي صنعت والتي يحتاجها الفايروس في الغلاف (Capsid) سوف تذهب للنواة وبذلك سوف يحاط RNA الفايروس بالغلاف ويكونان المحفظة (Neocliocapsid) ، اما البروتينات التي يحتاجها الفايروس في تصنيع المحفظة (Envelope) فأنها ستذهب الى قرب جدار الخلية المصابة.

7.مرحلة الانبعاث (Release)

الفايروس المتضاعف داخل نواة الخلية سوف ينبعث عبر قناة او ما اشبه بالقناة (Channel) ليخرج من خلال غشاء النواة الى السايتوبلازم الخلوي وثم يمر الى الجدار الخلوي ، اثناء مروره بالجدار سوف يحاط ببروتينات المحفظة ولينبعث من جدار الخلية بصورته الكاملة.

ان الفايروس الواحد الذي يدخل الخلية قد يتضاعف الى الف او الالاف ويصل الى المليون فايروس داخل الخلية الواحدة ، هذا العدد يعتمد على ضراوة الفايروس وظروف الخلية المصابة.

ان الفترة الواقعة بين دخول المسبب المرضي وظهوره والتي يطلق عليها بفترة الحضانة تبلغ في مرض النيوكاسل 3-6 ايام وفي الكمبورو 2-5 ايام ويعود هذا الى عدة عوامل منها :

1-كمية الجرعة (كمية الفايروس الداخلة للجسم)

2-الحالة المناعية للجسم.

3-الوراثة.

4-الحالة الصحية العامة.

5-ظروف الاجهاد والبيئة.

المناعة ضد البكتريا (Immunity to Bacteria)

هناك بعض العناصر التي يمتلكها الجسم والتي يطلق عليها بالعناصر التلقائية والتي تقوم بالتصدي للاصابات البكتيرية وتتمثل هذه العناصر في المقاومة الوراثية ، التغذية ، الجلد والعصارات الهاضمة ، والتأثير الهرموني.

التأثير الهرموني يأتي من بعض الهرمونات مثل Thyroxin وكذلك الجرع القليلة من الستيرويدات تكون منشطة للجهاز المناعي بينما الجرع الكبيرة من هذه الهرمونات تؤدي الى تثبيط في الاستجابة المناعية ، كذلك هناك بعض العناصر الكيميائية التي تساهم الاستجابة المناعية مثل إنزيم Lysozyme وهذا يكون قاتل للخلية البكتيرية ويوجد في جميع سوائل الجسم فيما عدا سوائل النخاع العصبي والشوكي ، ويقوم هذا الإنزيم بتحليل المحفظة في حالة وجودها وكذلك يعمل كعامل مساعد في عملية الطهي والتهيئة (Opsinization) مما يعجل او يزيد من عملية البلعمة.

من العناصر الكيميائية المهمة هي معدل وجود الحديد في سوائل الجسم ، حيث لوحظ بأن جميع انواع البكتريا تحتاج للحديد في عملية نموها ، والحديد في الجسم يكون دائماً مرتبط باحد البروتينات الناقلة في الجسم مثل لاكتوفيرين والترانسفيرين والفيرتين ، لكن لوحظ بأن هناك بعض انواع من البكتريا لها القدرة على انتاج بعض المواد التي تقوم باستقطاب الحديد وتوفيره في الوسط الذي تنمو فيه البكتريا ولذلك فأن الحالات التي يكون فيها الحديد موجود بتراكيز عالية وبشكل حر يؤدي الى حدوث الاصابات البكتيرية وبشكل اكبر من الحالات الاخرى.

ان المقاومة التي يبديها الجسم ضد الإصابة والتي قد يطلق عليها بالمناعة النوعية قد تكون كالآتي:

1.انتاج الاضداد ، وهذ الاضداد تقوم باختزال البكتريا وكذلك السموم والانزيمات التي قد تفرزها البكتريا.

2.قتل البكتريا بواسطة الاضداد والمتمم وايضاً بتأثير انزيم اللايسوزايم.

3.قتل البكتريا بواسطة خلايا Macrophage وايضاً يقوم المتم والاضداد بعوامل تهيئة للقضاء على البكتريا.

4.القتل داخل خلايا Macrophage وهذا يحدث من قبل خلايا Macrophage المنشطة.

ان قتل البكتريا داخل خلايا Macrophage يتكون في انواع معينة من الاصابات البكتيرية والتي قد تكون فيه البكتريا متركزة داخل الخلية وفي هذه الحالة تكون بعيدة عن متناول الاجسام المضادة والمتمم حيث يمكنها ان تتكاثر داخل الخلايا المصابة وبذلك فان استعمال المصول الممنعة لا يكون له تأثير في هذه الحالات بل تكون الاستجابة المناعية الخلوية هي الاساس في التصدي لهذه الاصبة ، وبالذات فأن خلايا Macrophage المنشطة تكون هي الاساس في عملية التصدي لهذه الاصابة وذلك لاحتواء هذه الخلايا على عدد كبير من الانزيمات الهاضمة التي يكون لها القدرة في هذه الحالة على قتل الخلية البكتيرية داخل الخلية.

وسائل المقاومة التي تمتلكها البكتريا ضد الجهاز المناعي

1.احتوائها على المحفظة.

2.هناك بعض الانواع من بكتريا Streptococcus تقوم بانتاج بعض السموم والتي يطلق عليها بالـ Streptolysin O – وهذه السموم تقوم بتحليل جدار خلايا Neutrophil (في الدواجن توجد خلايا Heterophil بدل Neutrophil) ، كذلك فان هناك مجموعة من بكتريا Staphyococcus وهذه المجموعة تحتوي على سطحها ما يطلق عليه ببروتين A وهذا البروتين يقوم بالارتباط مع الاضداد مما يعيق من عملية معادلة البكتريا للجسم المضاد.

مراحلة الاصابة البكتيرية

1.الالتصاق (Attachment)

يلتصق المسبب المرضي (بكتريا او فايروسات ..الخ) على الخلايا الطلائية المبطنة للجهاز الهضمي ، التنفسي ، التناسلي ، وهناك العديد من المصطلحات التي ترافق عملية الالتصاق فمثلاً يطلق Attachment على البكتريا التي تلتصق ، ويطلق مصطلح Adherence عند التصاق المستقبل البكتيري الموجود على الخلية البكتيرية مع مستقبل اخر موجود على الخلية الجسمية ، وعندما تقوم البكتريا بالسيطرة على الخلية والانسجة الرابطة القريبة منها وتبدأ ببناء مستعمرة يطلق مصطلح Localization او Colonization.

ان احباط عملية الالتصاق يعد احد التوجهات الجديدة التي تحد او تمنع من الاصابة البكتيرية في مراحلها الاولية ، واطلق على هذه العملية باسم التعرض المايكروبي المبكر او البروبايوتك (Probiotic) وسيتم شرحه لاحقاً ان شاء الله تعالى.

2.الاختراق (Penteration)

تقوم البكتريا باختراق الانسجة الرابطة المحيطة لمنطقة الاصابة عن طريق الانزيمات الهاضمة التي تحتويها مثل انزيم Collagenease و DNAase و Protenase والتي تساعدها على الهضم وتبقى البكتريا في نفس موقع الاختراق كما هو الحال في بكتريا *Staphylcoccus aureus* حيث يتم مهاجمته من قبل الخلايا البيض التي تتجمع في موقع لتهلك بعد التهام البكتريا ثم تتحول هذه الخلايا مع البكتريا الى قيح (Pus) وتدفع خارج الجسم.

تحدث حالة التهاب الجلد المواتي في حقول الامهات وخاصة في الاناث وبعض الديكة بجروح بعد تلوث منطقة الجلد ببكتريا *Staphyllococcus* وتبدأ تسير عبر الانسجة (أي يحدث توسع عبر النسيج حيث تقتل النسيج ومن ثم تسير) لذلك تظهر هذه الجروح كبقع سوداء ملتهبة على ظهر الامهات ، وسيتم شرح ذلك مفصلاً في فصل الامراض البكتيرية ان شاء الله تعالى.

3.الالتهام وحدوث الالتهاب.

اذا تمكنت البكتريا من التغلب على الحوجز الاولية ، فانها ستتمكن من تحفيز الاستجابات الاولية للمضيف وهذه الاستجابات تتركز حول الالتهام والالتهاب ، قد تلتهم البكتريا بعد دخولها الى الانسجة الداخلية من قبل الخلايا الملتهمة ،

وقد لاتكون هذه الوسيلة كفوءة في التخلص من هذه البكتريا ، وفي اغلب الاحيان تتكاثر البكتريا في مكان دخولها الا ان هذا التكاثر قد يكون محددة ، هذه الحالة قد تؤيد الى حدوث التهاب في المنطقة وعند ذلك تتمكن خلايا متخصصة

يمكن تصنيف الضرر الذي تحدثه الإحياء المجهرية الى نوعين :

اولاً–الاحياء المجهرية الملوثة للاغذية (Spoilage Food)

حيث تقوم الاحياء المجهرية بالتأثير في البروتينات والكاربوهيدرات والدهون والمادة الغذائية وتتكاثر هذه الاحياء المجهرية على المادة الغذائية وعندما تصل الى المستهلك فانها تكون فاسدة ، ولذلك فيجب ان تصل الاغذية بسرعة الى المستهلك قبل تعرضها للفساد وان أي طرائق للخزن مهما كانت كفائتها فسوف لاتستطيع ان تحافظ على نوعية جيدة للمادة الغذائية.

ثانياً–الاحياء المجهرية المرضية

وهي الاحياء التي عند تواجدها في داخل او خارج الجسم تسبب الحالة المرضية للمضيف.

المناعة ضد الفطريات (Immunity to Fungi)

تعد الفطريات صنفاً من المسببات المرضية التي تشبه النباتات في الكثير من خصائصها ، ولها اشكالاً مختلفة بعضها مستديراً وبيضوياً كالخمائر (Yeasts) والاخرى خيطية متفرعة كالعفن (Molds).

لقد شاع في الفترة الاخيرة حدوث الامراض الفطرية ولعل السبب في ذلك يعود الى زيادة استعمالات مضادات الحياة وكذلك استعمال بعض الادوية المثبطة للاستجابة المناعية والتعرض للاشعاع ، ان العديد من الفطريات المرضية توجد عادة على سطح الجسم او قد تكون موجودة في المحيط الذي يعيش فيه العائل لكنها لا تحدث المرض الا اذا حدثت بعض الاضطرابات في حالة العائل.

لا يمكن التخلص من هذه الكائنات الحية في الطبيعة بواسطة التطعيم او بالوسائل الاخرى التي ثبتت فائدتها ضد المسببات المرضية الاخرى ، كذلك فانه وبسبب وجود بعض هذه الفطريات ضمن الكائنات الحية التعايشية في الامعاء والتي قد تكون بعضها ممرضاً ، فأن مجرد الخلايا الفطرية في النموذج قد يعطي دليلاً خاطئاً عن حالة اصابة فطرية.

من اكثر الامراض التي تسببها الفطريات هي مرض الرشاشيات (Aspergillosis) والتسمم الفطري (Mycotoxin) ومن اشهر السموم الفطرية هو سم Aflatoxin ، وسوف نتاوله بالتفصيل ان شاء الله في فصل الامراض.

المناعة ضد الطفيليات (Immunity to Parasites)

تقع الطفيليات التي تصيب الحيوان والانسان ضمن انواع متغايرة ويمكن ان تقسم اعتماداً على عدد الخلايا والشكل الى اربع مجاميع ، البروتوزوا (او الطفيليات وحيدة الخلية) ، الديدان الخيطية ، الديدان المسطحة ، الديدان المفصلية ، اضافة الى الاختلافات المظهرية والفسلجية فأن موقع الطفيلي في العائل سواء كان في الامعاء او الفم او الدم او الانسجة الاخرى ذو اهمية بالغة وكذلك قدرته على العيش كطفيلي داخلي او كطفيلي خارجي كلها عوامل تحدد الاستجابة المناعية كلها عوامل تحدد الاستجابة لهذا الطفيلي.

ان الكثير من اصابات البروتوزوا المهمة في الطب هي في الغالب اصابات خلوية داخلية ، ان هذا الموقع يمنح الطفيلي محيطاً مناسباً للبقاء والتكاثر اضافة الى ذلك اخفاءه عن عوامل الجهاز المناعي ، اما الطفيليات الاخرى المتعددة الخلايا فهي عادة تعيش خارج الخلية ولا تتكاثر داخل العائل النهائي وتحدث مرضاً مزمناً نتيجة لوجودها المستمر ولفترة طويلة.

في الوقت حاضر تم انتاج لقاح ضد المسبب المرضي لكوكسيديا وهو بروتوزوا تسمى بالايمريا (سنتاول المرض في فصل الامراض ان شاء الله تعالى) ، وبالرغم من طبيعة الديدان والمستضدات الخاصة بها وكذلك طبيعة الاستجابات المناعية فلقد استعملت اللقاحات المتكونة من الطفيليات الميتة او خلاصات لهذه الطفيليات لاحداث المناعة ، الا ان النتائج لا تشير

في اغلب الاحيان الى حدوث حماية ضدها ، لذلك اتجهت الدراسات الى استعمال الطفيليات الحية في اللقاحات وذلك بعد تضعيفها بوسائل متعددة منها التشعيع ، ومع ذلك فان اللقاحات الطفيلية على المستوى التجاري قليلة ، ويمكن ان يكون من احسن الامثلة على هذه اللقاحات هو لقاح ديدان الرئة المستعمل بنجاح في اماكن كثيرة من العالم.

استعمالات الكلوبيولينات المناعية

اولا- استعمالات علاجية

تستعمل الكلوبيولينات المناعية منذ زمن بعيد في علاج مرض الكزاز (Tetannus) والذي تسببه بكتريا *Clostridium tetani* ، اذ يؤخذ السم (Toxin) المنتج من هذه البكتريا ويعطل ويسمى Toxoid ويعطل عن طريق الحرارة او استعمال الفورمالين) وهذا السم المعطل يحقن في حيوان ناقل مثل الارانب ، وبعد اخذ المصل من الارانب المحقونة تعزل الكلوبيولينات المناعية منه وكذلك الحال مع سم العقارب والافاعي.

تستعمل الكلوبيولينات المناعية كذلك في حالة اختلاف الدم ما بين الام والاب في الانسان والذي يسمى بعامل Rh^- ، فعندما تحمل الام Rh^- والاب Rh^+ والابن المولود Rh^+ فان الجنين يكون داخل بطن الام التي لا تحتوي على هذا المستضد وسيولد الجنين بدون اية مضاعفات صحية ، الا ان الجنين الثاني اذا كان موجب ايضاً فسيتعرض الى حالة تكسر كريات الدم الحمر ، وذلك لان الجنين عند الولادة الاولى ستتسرب قطرات من دمه الى الام حيث سيتولد اجسام مضادة ضده تكون موجودة في مصل دم الام كبروتينات ، وعند الحمل الثاني ومع انتقال مصل الدم ستنتقل الاضداد ومع دخوله الى الاوعية الدموية ستتكسر كريات الدم الحمر ولذلك يجب ان تحقن الام بحقنة خلال 72 ساعة والحقنة عبارة عن اضداد او كلوبيولينات مناعية، وذلك لكي تمنع الجهاز المناعي ان يستجيب الى هذا المستضد وبعبارة اخرى تتعادل ، أي تقوم الكلوبيولينات المناعية بمعادلة Rh وبذلك يمنع جسم الام من تكوين Anti Rh وخلال 72 ساعة.

تستعمل كذلك الكلوبيولينات المناعية كمدعمات (Fortified) لغذاء الاطفال ، حيث يتم عزل الكلوبيولينات المناعية الموجهة ضد بكتريا *E. coli* وكذلك ضد فايروسات الروتا (Rota viruses) المسببة لمرض الاسهال في الاطفال ، ثم تخلط هذه الكلوبيولينات المناعية مع حليب او الغذاء المكمل للاطفال ويكتب على غلاف او العلبة Fortified milk.

وفي الوقت الحاضر يتوقع الكثير من الباحثين ان تكون الكلوبيولينات المناعية كبديل مستقبلي للمضادات الحياتية في الادوية البيطرية ، ففي مجال الدواجن بدأت دراسات حديثة تنجح في علاج امراض مهمة باستعمال الكلوبيولينات المناعية مثل مرض الكوكسيديا و CRD وامراض بكتريا القولون والسالمونيلا والنيوكاسل والكمبورو.

واستعملت ايضا الكلوبيولينات المناعية مع الفايروسات الحية في عمليات تلقيح الدواجن ، حيث انتج لقاح ضد مرض الكمبورو يحتوي على فايروس الكمبورو المتوسط الضراوة مع الكلوبيولينات المناعية موجهة ضد المناعة الامية لهذا المرض (وقد شرح مفصلاً هذا الموضوع في فصل المناعة الامية وتداخلها مع عملية التلقيح).

انتج مختبر بحوث البط في جامعة كورنيل الاميركية منتوج يسمى بـ Bioyolk هو عبارة عن صفار البيض حاوي على Duck Virus Hepatitis Yolk Antibody (Type I) وكتب عليه التعليمات الاتية:

Duck Virus Hepatitis Yolk Antibody (Type I). This preparation is recommended for the prevention and treatment of duck virus hepatitis Type I on farms where the disease is not being controlled through other measures. One inoculation is usually sufficient to provide passive immunity for 7- 14 days. On farms where duck virus hepatitis is a serious problem, ducklings will require additional inoculations, 10 days apart, the number depending on the severity of the disease. This product is stored at refrigerator temperature (35-45°F), and is ready to use without dilution.

ثانياً – استعمالات تشخيصية

تستعمل الكلوبيولينات المناعية كاحد الطرائق التي يتم من خلالها تشخيص بعض المركبات او بعض المواد عن المواد الاخرى حيث تستعمل كاداة عمل في علم الامصال (Serology) والذي يدرس تفاعل الاضداد مع المستضد داخل الدم واستعملت الكلوبيولينات المناعية للتشخيص ومن هذه الفحوصات :

أ–عند الكشف عن وجود مسبب مرضي ، فمثلاً عند الكشف عن مرض التايفوئيد يمكن اخذ عينة كقطرة دم وعند وجود الاصابة يعني ان هناك اضداد في مصل الدم المصاب ولهذا يؤخذ قطرة من المستضد والذي هو عبارة عن المسبب المرضي كبكتريا *Salmonella typhi* في حالة التايفوئيد ويحصل تكتل والذي يشير الى ان المرض موجود وعند عدم وجود تكتل بالكريات او خلايا الدم يعني ذلك عدم وجود المرض.

ب–اجراء اختبار فحص الحمل ، حيث ان kit المستعمل في اختبار فحص الحمل هو عبارة عن كلوبيولينات مناعية (اضداد) ضد هرمون Human Chromo Gonadotrophic والذي يرمز له HCG ، حيث ان الهرمون الاخير يعزل من مصل الدم المراة الحامل وبعد حقنه في الارانب سيتم الحصول على اضداد (Anti HCG) ، وعند اخذ قطرة من بول المراة الحامل وخلطه مع الاضداد الموجودة في الـ Kit وعندما تكون المراة حامل فان الاضداد ستتفاعل مع قطرة البول ويكون التفاعل اما على شكل لون او على شكل تكتل وحسب الشركة المنتجة للـ Kit.

ج–فحص مجاميع الدم (Blood Group)

فمن المعروف ان هناك عدة مجاميع للدم ، ويتم التمييز بين هذه المجاميع عن طريق التفاعل بين الضد والمستضد ، حيث يوجد مستقبلات A و B على الكرية ، ويتم سحب قطرة دم ويضاف لها اضداد لصنف معين ، فعند حصول تجلط مع A يعني ان صنف الدم A واذا تجلط مع B يعني صنف الدم B وعند حصول التجلط في كلا الاثنين يعني صنف الدم AB ، اما اذا لم يحصل أي تجلط فان صنف الدم هو O.

د–تستعمل للتشخيص وعلاج مرض السرطان ، حيث يتم عمل كلوبيولينات مناعية ضد الخلايا السرطانية وتربط باليود المشع 125 ثم تحقن ، حيث تذهب الاضداد الى مكان او موقع الاصابة وياخذ دوره في مهاجمة الاورام السرطانية ، وبهذا سيتم استعمالها للتشخيص والعلاج معاً .

هـ–استعمال الكلوبيولينات المناعية في الكشف عن غش اللحوم المعلبة ، إذ يمكن اخذ احد بروتينات اللحم ، حيث تنقسم الى انسجة رابطة وSarcoplasma و Myofibrile Proteins ، ويتم ترسيب احد هذه المواد الثلاثة وتنقيتها ومن ثم انتاج الكلوبيولينات المناعية وتحقن في الارانب لانتاج Antiforce myofibril prtein ، ويؤخذ عينة من اللحم ويتم ترسيب احد بروتينات اللحم ومن ثم تنقيتها وانتاج الـAnti للحيوان المعين ومن ثم تشخيص الغش ، كذلك في مجال غش اللحوم فانه يتم استعمال او توجيه الكلوبيولينات المناعية ضد الانسجة الدهنية (Adipose Tissues).

ثالثاً- استعمالات فسلجية

يمكن تعطيل هرمون معين لاجل افساح المجال امام هرمون اخر لاستمرار افرازات وفعاليات معينة مثل هرمونات منع الحمل وهرمونات النمو في الدواجن.

رابعاً-استعمالات كيميائية

تستعمل الكلوبيولينات المناعية لتنقية بعض المواد الكيميائية وذلك عن طريق حقن المواد النقية (واعتبارها كمستضد) في الدجاج مثلاً ، وعند جمع البيض من هذا الدجاج وبعد عزل الكلوبيولينات المناعية منه ، تؤخذ هذه الكلوبيولينات المناعية ويتم اما ربطها على اعمدة فصل او توضع في محاليل فصل لكي ترتبط هذه الكلوبيولينات المناعية مع المواد التي يراد تنقيتها ، وكذلك يمكن ان تستعمل نفس الطريقة لقياس تركيز مادة معينة ، ومثال على استعمال الكلوبيولينات المناعية في الكيمياء هو عزل وتنقية بعض الهرمونات والانزيمات وكذلك قياس تركيز بعض الهرمونات والانزيمات.

التلقيح واللقاحات في حقول الدواجن

يقوم جميع المربين وأصحاب الحقول الدواجن بعمليات تلقيح متكررة لقطعانهم وذلك لحماية هذه القطعان من الامراض الفايروسية الخطيرة مثل مرض النيوكاسل والكمبورو والمرك ومرض متلازمة انخفاض انتاج البيض (Egg Drop Syndrome) ومرض التهاب الشعب الهوائية المعدي (Infectious Bronochitis) ، احياناً او في حالات كثيرة يعتمد نجاح التربية في المشروع على مدى قيام المربي بعملية التلقيح باسلوب صحيح وناجح ، العجلة وعدم معرفة بعض المربين باللقاحات وعدم التعامل السليم معها وعدم اتباع الاجراءات المطلوبة عند اجراء عملية التلقيح قد تؤدي الى كوارث مرضية كبيرة وتعرض المربي و المشروع لخسائر اقتصادية هائلة ، لذلك من الضروري ان يعرف المربي ما هو اللقاح ؟ وكيف يتعامل مع هذه اللقاحات أثناء النقل والخزن ؟ وما هي الاجراءات او الخطوات الصحيحة عند إجراء عملية التلقيح ؟ وهل من الافضل القيام بعملية التلقيح عن طريق ماء الشرب او الرش او قطرة بالعين او الحقن تحت الجلد؟ ، ولماذا؟ ، الاجابة عن كل هذه الأسئلة هي محور حديثنا في الصفحات اللاحقة.

المصادر

Coutts, G. S. (1981). *Poultry diseases under modern management* (No. 2nd edition). Saiga Publishing Co., 1Royal Parade.

Delves, P. J., Martin, S. J., Burton, D. R., & Roitt, I. M.(2017). *Roitt's essential immunology*. John Wiley & Sons.\

Pattison, M., McMullin, P., Bradbury, J. M., & Alexander, D.(Eds.). (2007). *Poultry diseases*. Elsevier Health Sciences.

Sharma, J. (2018). *Avian cellular immunology*. Routledge.

Stevens, C. D., & Miller, L. E. (2016). *Clinical Immunology andSerology: A Laboratory Perspetive*. FA Davis.

Tizard, I. R. (2017). *Veterinary Immunology-E-Book*. ElsevierHealth Sciences